

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

УТВЕРЖДЕНО
решением Координационного совета
Передовой инженерной школы
«ФармИнжиниринг»

«5» июня 2024 г., протокол №2
Председатель А.Н.Фомин
«5» июня 2024 г.



РАБОЧАЯ ПРОГРАММА ДИСЦИПЛИНЫ

Дисциплина	<i>Биоинжиниринг. Генная инженерия</i>
Факультет	Передовая инженерная школа «ФармИнжиниринг»
Кафедра	Передовая инженерная школа «ФармИнжиниринг»
Курс	1

Направление (специальность) 06.04.01 «Биология»
код направления (специальности), полное наименование

Направленность (профиль/специализация) Биофарминжиниринг
полное наименование

Форма обучения очная
очная, заочная, очно-заочная (указать только те, которые реализуются)

Дата введения в учебный процесс УлГУ: «01» сентября 2024 г.

Программа актуализирована на заседании КС ПИШ: протокол № _____ от _____ 20____ г.
 Программа актуализирована на заседании КС ПИШ: протокол № _____ от _____ 20____ г.
 Программа актуализирована на заседании КС ПИШ: протокол № _____ от _____ 20____ г.
 Программа актуализирована на заседании КС ПИШ: протокол № _____ от _____ 20____ г.
 Программа актуализирована на заседании КС ПИШ: протокол № _____ от _____ 20____ г.

Сведения о разработчиках:

ФИО	Кафедра	Должность, ученая степень, звание
Расторгуева Евгения Владимировна	Лаборатория разработки пептидных лекарственных препаратов и вакцин	Младший научный сотрудник

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ:

Цель дисциплины - совершенствование и получение новых компетенций по использованию современных генетических методов.

Задача дисциплины – способность к созданию генетически модифицированных конструкций для дальнейшей экспрессии в бактериальных клетках, получение белковых молекул в электрофоретически-гомогенном состоянии, а также анализ результатов ПЦР, что необходимо для профессиональной деятельности в рамках разработки генетического продукта.

2. МЕСТО ДИСЦИПЛИНЫ В СТРУКТУРЕ ОПОП:

Дисциплина «Биоинжиниринг. Генная инженерия» изучается в 2 семестре и относится к обязательной части дисциплин блока Б1.В.ДВ.02.03 направления подготовки 06.04.01 «Биология». Дисциплина формирует практические навыки использования в профессиональной деятельности современных генетических методов.

3. ПЕРЕЧЕНЬ ПЛАНИРУЕМЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ОБУЧЕНИЯ ПО ДИСЦИПЛИНЕ, СООТНЕСЕННЫХ С ПЛАНИРУЕМЫМИ РЕЗУЛЬТАТАМИ ОСВОЕНИЯ ОСНОВНОЙ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЫ

Код и наименование реализуемой компетенции	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине (модулю), соотнесенных с индикаторами достижения компетенций
ПК – 1 Способен производить подготовительные работы для осуществления биотехнологического процесса получения биомедицинского продукта: тест-систем/генно-инженерного продукта/радиофармпрепарата	ИД-1.1пк1 Знает основные принципы и этапы биотехнологического процесса, правила безопасности при работе с биологическими материалами и реагентами ИД-1.2пк1 Умеет выбирать и подготавливать необходимые реагенты и материалы для проведения биотехнологических процессов ИД-1.3пк1 Владеет навыком работы с лабораторным оборудованием и приборами, необходимыми для проведения биотехнологических процессов
ПК – 2 Способен проводить биотехнологический процесс с использованием живых клеток и ферментативных реакций	ИД-1.1пк2 Знает основные принципы и этапы биотехнологического процесса с использованием живых клеток и ферментов ИД-1.2пк2 Умеет анализировать используемую технологию на соответствие установленным требованиям и управляемость технологических процессов, организовывать разработку и внедрение в производство оптимизированных технологических процессов ИД-1.3пк2 Владеет навыками культивирования микроорганизмов и эукариотических клеток в различных условиях, методами сепарации и концентрации биологических веществ, полученных в

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

	результате биотехнологических процессов с использованием живых клеток и ферментов
ПК – 3 Способен проводить исследования по разработке биомедицинского продукта, а также управлять процессом	ИД-1.1пк3 Знает правила безопасности при проведении исследований по разработке биомедицинского продукта ИД-1.2пк3 Умеет: формулировать цели и задачи исследований по разработке биомедицинского продукта, анализировать результаты исследований и делать выводы о возможности использования полученного продукта в медицинских целях. ИД-1.3пк3 Владеет навыком выбора оптимальных методов и подходов для проведения исследований по разработке биомедицинского продукта, навыком планирования и организации проведения исследований по разработке биомедицинского продукта.

4. ОБЩАЯ ТРУДОЕМКОСТЬ ДИСЦИПЛИНЫ

4.1. Объем дисциплины в зачетных единицах (всего) 6

4.2. Объем дисциплины по видам учебной работы (в часах)

Вид учебной работы	Количество часов (форма обучения)	
	Всего по плану	очная
		В т.ч. по семестрам 2
Контактная работа обучающихся с преподавателем в соответствии с УП	90	90
Аудиторные занятия:		
• лекции	10/10	10/10
• семинары и практические занятия	40/40	40/40
• лабораторные работы, практикумы	40	40
Самостоятельная работа	90	90
Форма текущего контроля знаний и контроля самостоятельной работы: тестирование, контр. работа, коллоквиум, реферат и др. (не менее 2 видов)		собеседование, тестирование
Курсовая работа		---
Виды промежуточной аттестации (экзамен, зачет)	36	Экзамен(36)
Всего часов по дисциплине	216	216

В случае необходимости использования в учебном процессе частично/исключительно дистанционных образовательных технологий в таблице через слеш указывается количество часов работы ЛЛС с обучающимися для проведения занятий в дистанционном формате с применением электронного обучения.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

4.3. Содержание дисциплины. Распределение часов по темам и видам учебной работы:

Форма обучения очная

Название и разделов и тем	Всего	Виды учебных занятий					Форма текущего контроля знаний
		Аудиторные занятия			Занятия в интерактивной форме	Самостоятельная работа	
		лекции	Практические занятия,	Лабораторные работы, проекты, исследования			
1. Введение в генную инженерию. Принципы конструирования рекомбинантных организмов	19	2	4	0	2	9	Практические занятия, тестирование, собеседование
2.1 Работа с нуклеиновыми кислотами в бактериальных клетках. Выделение ДНК из бактериальных клеток.	19	2	4	8	2	9	Выполнение лабораторных заданий, практических заданий, тестирование
2.2 Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток.	19	2	4	4	2	9	Выполнение лабораторных заданий, практических заданий, тестирование
2.3 Электрофорез нуклеиновых кислот и визуализации результатов	17	0	4	4	2	9	Выполнение лабораторных заданий, практических заданий, тестирование
2.4 Клонирование ДНК. Полимеразная цепная реакция	17	0	4	4	2	9	Выполнение лабораторных заданий, практических заданий, тестирование
2.5 Трансформация бактериальных клеток	17	0	4	4	2	9	Выполнение лабораторных заданий,

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

							практических заданий, тестирование
3. Экспрессия и выделение целевых белков 3.1 Отбор штаммов продуцентов белков	19	2	4	4	2	9	Выполнение лабораторных заданий, практических заданий, тестирование
3.2 Гиперэкспрессия белков в большом объеме	17	0	4	6	1	9	Выполнение лабораторных заданий, практических заданий, тестирование
3.3 Очистка белков. Определение концентрации белка по методу Мэрион Брэдфорд [Bradford, 1976]	17	0	4	6	1	9	Выполнение лабораторных заданий, практических заданий, тестирование
4. Трансгенные растения и животные	9	1	2	0	1	4	Выполнение, практических заданий, тестирование, собеседование
5. Генная терапия	10	1	2	0	1	5	Выполнение практических заданий, тестирование, собеседование
Итого:	180	10	40	40	<u>18</u>	90	+36 экзамен

5. СОДЕРЖАНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Тема 1. Введение в генную инженерию. Принципы конструирования рекомбинантных организмов. Технологии рекомбинантных ДНК и общие принципы конструирования промышленно важных продуцентов для биотехнологии. Молекулярные основы генетической инженерии. Ферменты для молекулярного клонирования. Общая схема молекулярного клонирования на примере создания штамма-продуцента в кишечной палочке. Общая схема вектора на примере бактериальной экспрессионной плазмиды.

Тема 2. Работа с нуклеиновыми кислотами в бактериальных клетках

Методы генетической трансформации бактерий: электропорация и химическая трансформация. Понятие компетентности. Индуцированная и естественная компетентность. Методы идентификации рекомбинантных клонов.

Клонирование гена по методу Гибсона. Химическая трансформация штамма *E. coli*. Выделение плазмидной ДНК с помощью коммерческих наборов. ПЦР с колоний. Принцип электрофореза нуклеиновых кислот. Маркеры молекулярного веса. Визуализация гелей с ДНК. Измерение концентрации ДНК с помощью NanoDrop: соотношение 260/230 и

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

260/280.

Тема 3. Экспрессия и выделение целевых белков

Проблемы экспрессии чужеродных генов в целевом организме. Причины использования разнообразных систем (простейшие, растения и животные) для биопродукции белков. Гетерологичная экспрессия, посттрансляционные модификации и получение функционально активных аутентичных белков. Гликозилирование рекомбинантных белков в зависимости от клетки-хозяина. Стабилизация целевых продуктов в клетке.

Свойства белковых молекул: денатурация, ренатурация и т.д. Электрофорез белков в денатурирующих условиях. Метод аффинной хроматографии для очистки белков. Принципы методов окрашивания белковых гелей с помощью кумасси синего и нитратного серебра.

Тема 4. Генетически важные продуценты. Трансгенные растения и животные.

Генно-инженерные организмы в хозяйственной деятельности человека и перспективы их дальнейшего использования. Использование рекомбинантных микроорганизмов различных систематических групп для получения коммерческих продуктов (ферменты, инсулин, гормон роста, интерфероны, моноклональные антитела и т.д.). Трансгенные растения и животные как биореакторы для получения ценных для промышленности и медицины органических соединений. Конструирование трансгенных растений. Векторные системы для растений на основе Ti-плазмид и фитовирусов. Культуры растительных клеток.

Тема 5. Генная терапия

Сайт-специфическое редактирование генома с использованием рекомбинантных эндонуклеаз. Рекомбинантные эндонуклеазы. Сайт-специфическое редактирование генома с помощью эндонуклеазы с "цинковыми пальцами". Использование системы TALEN для сайт-специфического редактирования генома. Метод CRISPR-Cas9 для редактирования генома, роль микроРНК.

6. ТЕМЫ ПРАКТИЧЕСКИХ И СЕМИНАРСКИХ ЗАНЯТИЙ

Тема 1. Введение в генную инженерию. Принципы конструирования рекомбинантных организмов.

- Моделирование генетических конструкций: Экспрессионные плазмиды, Штаммы E. coli для экспрессии рекомбинантных белков, Варианты нокаута генов.
- Методы клонирования ДНК: Restriction Enzyme Ligation, Gibson Assembly, Gateway Cloning, Golden Gate Assembly, TOPO (TA) Cloning.
- Векторы для клонирования ДНК.
- Требования к праймерам.

Изучение учебной, научной и справочной литературы.

Оформление результатов работы.

Тема 2. Работа с нуклеиновыми кислотами в бактериальных клетках

- Методы генетической трансформации бактерий: электропорация и химическая трансформация.
- Понятие компетентности. Индуцированная и естественная компетентность.
- Методы идентификации рекомбинантных клонов.
- Клонирование гена по методу Гибсона.
- Химическая трансформация штамма E. coli.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

- Выделение плазмидной ДНК с помощью коммерческих наборов.
- ПЦР с колоний.
- Принцип электрофореза нуклеиновых кислот.
- Маркеры молекулярного веса. Визуализация гелей с ДНК.
- Измерение концентрации ДНК с помощью NanoDrop: соотношение 260/230 и 260/280.

Изучение учебной, научной и справочной литературы.

Оформление результатов работы.

Тема 3. Экспрессия и выделение целевых белков

- Отбор штаммов продуцентов белков
- Электрофорез белков в денатурирующих условиях.
- Гиперэкспрессия белков в большом объеме
- Метод аффинной хроматографии для очистки белков.
- Принципы методов окрашивания белковых гелей с помощью кумасси синего и нитратного серебра.

Изучение учебной, научной и справочной литературы.

Оформление результатов работы.

Тема 4. Генетически важные продуценты. Трансгенные растения и животные.

- Биопродукция ценных для промышленности и медицины органических соединений в растениях и растительных клетках.
- Преимущества и проблемы биопродукции в растительной системе. Метаболическая инженерия растений.
- Создание растений, устойчивых к болезням, вредителям (растения, синтезирующие инсектициды), гербицидам (на примере раундапа).
- Изменение пищевой ценности и внешнего вида растений. Повышение продуктивности и устойчивости к внешней среде.
- Генетически-модифицированные продукты - мифы и реальность.
- Коммерциализация трансгенных растений и биобезопасность.

Изучение учебной, научной и справочной литературы.

Оформление результатов работы.

Тема 5. Генная терапия

- Сайт-специфическое редактирование генома с использованием рекомбинантных эндонуклеаз. Рекомбинантные эндонуклеазы.
- Сайт-специфическое редактирование генома с помощью эндонуклеазы с "цинковыми пальцами".
- Использование системы TALEN для сайт-специфического редактирования генома.
- Метод CRISPR-Cas9 для редактирования генома, роль микроРНК.

Изучение учебной, научной и справочной литературы.

Оформление результатов работы.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

7. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ, ПРАКТИКУМЫ

Тема 2. Работа с нуклеиновыми кислотами в бактериальных клетках

Лабораторная работа №1

Выделение геномной ДНК из клеток бактерий методом фенол-хлороформной экстракции

1. Культуру бактерий растить ночь на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 5 мл в пробирке (см.микробиологию).

2. Осадить клетки из 5 мл культуры в эппендорф: 1.5 мл культуры перенести в эппендорф, цф 1-2 мин при 13000 об/мин, супер вылить, снова добавить 1.5 мл культуры и цф. Удалить дозатором всю надосадочную жидкость.

3. Ресуспендировать клетки в 500 мкл 10 мМ Трис HCl pH 8.0.

Для грам-положительных бактерий:

3.1. Для разрушения клеточной стенки бактерий внести 25-50 мкл раствора лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 20-60 мин при 37°C, осторожно перемешивать переворачивая пробирку, суспензия должна стать более прозрачной и коричневее. В случае лактобацилл внести 100 мкл лизоцима с концентрацией 20 мг/мл, инкубировать 1-2 часа при 37°C.

4. Вносить порциями по 10 мкл 10%-ный раствор SDS, осторожно перемешивать, переворачивая пробирку до достижения прозрачного раствора вязкой субстанции (SDS разрушает мембрану клетки и ДНК оказывается в растворе, делая его вязким и тягучим). Если раствор не стал вязким, то значит клетки не разрушились и дальше продолжать не имеет смысла.

5. Внести 500 мкл смеси фенола, хлороформа и изоамилового спирта (25:24:1) и интенсивно потрясти, чтобы раствор стал как молоко. При этом происходит денатурация белков, переход жиров и липидов в органическую фазу.

6. Центрифугировать 10 мин на максимальной скорости

7. Перенести верхнюю фазу 450 мкл (НЕ ТРОГАЯ БЕЛЫЙ ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ СЛОЙ) в 1 мл изопропанола. При этом неизбежно уменьшается до 1/5 объема водной фазы. На практике лучше пожертвовать этим объемом сейчас, чем чистотой препарата впоследствии. Для получения высокоочищенной ДНК повторить п.5-7 2-3 раза.

8. Осторожно намотать ДНК (которая будет выглядеть как вата) на наконечник на 200 мкл, зубочистку или стеклянную палочку. Если ДНК выпало мало, осторожно перемешать содержимое эппендорфа и повторить наматывание ДНК.

9. Опустить наконечник/палочку с ДНК в раствор 96% этанола, затем подсушить. Пересушивать осадок нельзя, в полностью высушенном виде он становится практически нерастворим в воде. Обычно осадки сушат на открытом воздухе не более получаса, под потоком нагретого воздуха. Далее намотанную ДНК опустить в эппендорф с 200-400 мкл деионизированной воды или буфера TE для растворения ДНК.

Быстрое выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток для электрофоретического анализа методом фенол-хлороформной экстракции.

Метод подходит для быстрой оценки наличия плазмиды, ее размера по сравнению с исходным вектором. Качество ДНК достаточно для электрофоретического анализа, но не более того.

Удобно использовать для скрининга колоний. Недостаток – необходимость работать с фенолом (необходим вытяжной шкаф), а также в геле видны рибосомальные РНК, поэтому необходимы отрицательный и положительный контроли.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

1. Культуру растить ночь на богатой среде (LB, питательный бульон БТН или МПБ) с качанием, 1-3 мл в пробирке.
2. Осадить клетки в эппендорф: 0.5 мл культуры перенести в эппендорф, центрифугировать 1-2 мин при 13000 об/мин. Удалить надосадочную жидкость, оставив 50-100 мкл.
3. Внести 10 мкл 10-кратного буфера для внесения, содержащего додецил сульфат натрия (SDS). Клетки ресуспендировать дозатором или на вортексе в остатках супернатанта.
4. Внести 50 мкл смеси фенола и хлороформа (1:1) и интенсивно потрясти, чтобы раствор стал как молоко. 10 5. Центрифугировать 5 мин на максимальной скорости.
6. 10 мкл верхней фазы (НЕ ТРОГАЯ БЕЛЫЙ ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ СЛОЙ) использовать для электрофореза.

Лабораторная работа №3. Электрофорез нуклеиновых кислот и визуализации результатов

Электрофорез – метод разделения макромолекул, различающихся по таким параметрам, как размеры (или молекулярная масса), пространственная конфигурация, вторичная структура и электрический заряд.

В лунки геля наносится проба ДНК, уже содержащий индикаторный краситель. Форму с гелем, содержащим нанесенные образцы переносят в камеру для электрофореза, заполненную буфером, камеру подключают к источнику питания (напряжение 1-15 В/см длины геля), и проводят электрофоретическое разделение ДНК в направлении от катода к аноду. Чем ниже напряжение, тем выше разделяющая способность геля, полосы более четкие из-за меньшей диффузии, но электрофорез занимает больше времени. Контроль за электрофоретическим разделением осуществляется визуально по движению полосы красителя. По окончании электрофоретического разделения (когда индикаторный краситель достиг края геля) вынимают гель из формы и просматривают в ультрафиолетовом свете с помощью УФ-транслюминатора (желательно фотографируют).

Горизонтальный электрофорез в агарозном геле

1. Готовят 1х ТВЕ в объеме, достаточном для заполнения камеры для электрофореза и приготовления геля.
2. Добавляют к 1 х ТВЕ агарозу в количестве, необходимом для получения 0.8 – 2% раствора, и нагревают в микроволновой печи до полного расплавления агарозы. 1% гель является относительно универсальным.
3. Охлаждают смесь до +/- 50 °С. За время охлаждения агарозы, подготавливают заливочный столик и кювету для электрофореза.
4. Добавляют к раствору агарозы краситель (см. п. 2.3) и осторожно перемешивают, избегая появления в геле пузырьков воздуха.
5. Теплую агарозу выливают в кювету для геля и равномерно распределяют ее по кювете. Вертикально вставляют гребенку так, чтобы ее зубцы не доставали до дна примерно 1-1.5 мм.
6. Оставляют кювету с агарозным гелем на 30 мин, затем осторожно удаляют гребенку и липкую ленту. Кювету с гелем помещают в электрофорезную камеру, содержащую необходимое количество 1хТБЭ.
7. Подготавливают к электрофорезу образцы исследуемой и маркерной ДНК, для чего смешивают их с буфером для нанесения (5:1). Чтобы получить четкий сигнал при окрашивании бромистым этидием-EtBr, в лунку шириной 5 мм достаточно внести 200 нг маркерной ДНК. Для построения стандартной кривой необходимо использовать маркерные фрагменты, длина которых примерно равна длине исследуемой ДНК.
8. Осторожно вносят в лунки исследуемую и маркерную ДНК. для повышения точности определения размера маркерную ДНК наносят по обе стороны от исследуемой.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

9. Проводят электрофорез при градиенте напряженности 1 – 10В на 1 см геля.
10. Просматривают гель в УФ-свете на трансиллюминаторе и фотографируют.

Окраска ДНК

При электрофорезе используется два типа красителей (лидирующие и флюоресцентные). В качестве лидирующих красителей используют бромфеноловый синий, оранжевый G, крезоловый красный, ксиленцианол. Эти красители движутся в том же направлении что и ДНК, но с разной скоростью (рисунок 3). Зная размер ДНК продукта, можно оценить его положение в геле по положению индикаторных красителей. Для детекции ДНК в геле используются различные флюоресцентные красители, которые способны связываться с двуцепочечной ДНК и светиться в ультрафиолетовом свете.

Растворы

1. 10x TBE буфер (Tris-Borate-EDTA): 108 г Трис основного, 55 г борной кислоты, 9.3 г ЭДТА натриевой соли, довести до 1 литра деионизованной водой. рН 8.3 и не требует доведения.
2. 50x TAE, (Tris-Acetate-EDTA): 242 г Трис основного, 57.1 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл 0.5М EDTA, довести до 1 литра деионизованной водой. Довести рН до 8.5. TAE буфер при нагревании (в отличие от TBE) "неустойчив" и чтобы все было ок, следует агарозу растворять в воде, а потом в этот раствор добавлять TAE (50x).
3. Агароза: для 1% геля - смешать 100 мл воды и 1 грамм агарозы в стеклянной посуде. Доведите раствор до кипения в микроволновой печи при высокой мощности. Вытащите сосуд из печи и размешайте до ресуспендирования осевшей агарозы. Охладите до температуры, комфортной для дальнейшей работы. В мерном цилиндре доведите объем дистиллированной водой до 100 мл. В форму для геля установите гребенку под будущие лунки. Влейте охлажденную агарозу в форму. 4. 6x буфер для внесения в лунку геля: 0.25% бромфеноловый синий, 0.25% ксиленцианол, 40% сахараза или 40% глицерин в 1x TBE. 5. Бромистый этидий EtBr: для внесения в гель 10 мг/мл в стерильной дистиллированной воде. Для окрашивания гелей 0.1 мг/мл в дистиллированной воде

Лабораторная работа №3. Клонирование ДНК. Полимеразная цепная реакция

ЦЕЛЬ: освоить КЛОНИРОВАНИЕ ДНК и ПЦР

КЛОНИРОВАНИЕ в биологии подразумевает метод получения нескольких идентичных организмов путем бесполого (в том числе вегетативного) размножения. Таким способом на протяжении миллионов лет размножаются в природе многие виды растений и животных. Сейчас термин «клонирование» обычно используется в более узком смысле и означает копирование клеток, генов, антител и даже многоклеточных организмов в лабораторных условиях. Появившиеся в результате бесполого размножения экземпляры по определению генетически одинаковы, однако и у них можно наблюдать наследственную изменчивость, обусловленную случайными мутациями или создаваемую искусственно лабораторными методами. В молекулярной генетике термин «клонировать ген» означает получить большое количество его копий *in vivo*. Клонирование фрагмента ДНК включает несколько последовательных этапов:

- 1) Получение фрагмента ДНК (с помощью полимеразной цепной реакции, или рестрикции)
- 2) Встраивание клонируемого (чужеродного) фрагмента ДНК в векторную молекулу ДНК (рестрикция и лигирование);
- 3) Проникновение этой конструкции в бактериальную клетку-хозяина (генетическая трансформация);
- 4) Идентификация клеток, содержащих рекомбинантную ДНК, и их отбор (как правило, осуществляется на селективной среде)
- 5) Получение необходимого количества клеток, содержащих рекомбинантную ДНК (собственно клонирование). При необходимости индуцируют экспрессию клонированного

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

гена в клетках-хозяевах и получают кодируемый им белок

Определение концентрации нуклеиновых кислот

Оптическая плотность раствора нуклеиновых кислот при длине волны 260 нм, равная 1, соответствует 50 мкг/мл двухцепочечных ДНК и РНК, 40 мкг/мл одноцепочечных ДНК и РНК и 20 мкг/мл олигонуклеотидов. По известной оптической плотности раствора можно рассчитать концентрацию, мкг/мкл, по соответствующим формулам: для двух цепей полинуклеотидов: $\Delta A_{260} \times \text{разбавление} \times 0.05$; для одиночных цепей ДНК: $\Delta A_{260} \times \text{разбавление} \times 0.037$; для одиночных цепей РНК: $\Delta A_{260} \times \text{разбавление} \times 0.04$; для олигонуклеотидов: $\Delta A_{260} \times \text{разбавление} \times 0.02$, где ΔA_{260} - разница оптических плотностей раствора нуклеиновых кислот и растворителя, которым практически всегда является стерильная деионизованная вода.

Рестрикция

Для проведения успешной рестрикции необходимо соблюдать ряд условий.

- 1) Использовать корректный буфер (прилагаемый к ферменту)
- 2) Количество ДНК: От 1 до 10 мкг, поскольку большие количества ДНК увеличивают вязкость раствора, что приводит к ингибированию реакции
- 3) Количество фермента: 1 единица на 1 мкг ДНК. Избыток фермента может приводить к неспецифическому распознаванию ДНК
- 4) Объем смеси: от 10 до 50 мкл
- 5) Время рестрикции – 1-4 часа. В некоторых случаях допускается проводить рестрикцию в течение ночи малым количеством фермента.

Порядок действий:

1. В микропробирку внести 1 мкг плазмидной ДНК
2. Внести 3 мкл рестрикционного буфера
3. Внести рестриктазу в объеме, соответствующем 1 единице активности,
4. Довести объем смеси до 30 мкл деионизованной водой, и поставить в термостат на 2 часа. Результат рестрикции проверить методом электрофореза.

Дефосфорилирование ДНК

1. На 50 мкл реакционной смеси добавить:
5 мкл десятикратного буфера, 0.5-5 мкг ДНК, деионизованная вода – до 50 мкл, 1-2 мкл (5-10 ед.) щелочной фосфатазы (порядка 1-2 ед. на 1 мкг ДНК).
2. Инкубировать в течение 0,5-1 часа при 37°C.
3. Очистить ДНК гель-фильтрацией, на спин-колонках или путем экстракции фенолом-хлороформом с последующим высаживанием 96%-ным этанолом для удаления фосфатазы. Реакцию можно проводить прямо после реакции рестрикции, внося фосфатазу непосредственно в рестрикционную смесь.

В некоторых случаях бывает удобно использовать термолабильную щелочную фосфатазу из *A. undina* P2. В этом случае необходимо инкубировать при 25°C!!! (Инкубация при 37°C приводит к частичной инактивации фермента).

Лигирование ДНК

Лигаза (лат. ligāre — сшивать, соединять) — фермент, катализирующий соединение двух молекул ДНК с образованием новой фосфорноэфирной связи (лигирование).

Буфер для лигирования как правило поставляется в комплекте с ферментом и содержит АТФ. Поэтому данный буфер не следует размораживать много раз во избежание распада АТФ. При первой разморозке буфера

рекомендуется слегка нагреть его (до 35-37 °С) и несколько раз встряхнуть до полного растворения осадка. Затем расфасовать его небольшими объемами (20-50 мкл) в отдельные пробирки, заморозить и использовать эти аликвоты не более 2-3 раз.

Реакцию лигирования следует проводить в минимальном объеме (10-20 мкл) с целью

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

увеличения концентрации концов ДНК, и, соответственно эффективности сшивки. Рекомендуемая концентрация концов ДНК – от 0.1 до 1 мкМ. Следует учесть, что эффективность сшивки выступающих «липких» концов выше, чем «тупых» концов. Соответственно, более протяженные «липкие» концы сшиваются лучше коротких.

Стандартную реакцию лигирования можно проводить при 16 °С в течение 0.5-2 час. Но в большинстве случаев наилучшие результаты достигаются при инкубировании реакционной смеси в течение ночи при 4-6 °С.

Соотношение сшиваемых фрагментов ДНК подбирается экспериментальным путем. Например, при необходимости сшивки векторной плазмиды и фрагмента(ов) геномной ДНК можно использовать соотношения от 1:5 до 1:0.5, соответственно.

1. На 10 мкл реакционной смеси смешать

Реакционный буфер (десятикратный) – 1 мкл;

Фрагмент ДНК 1 (0.1 мг/мл) – 1 мкл;

Фрагмент ДНК 2 (0.1 мг/мл) – 1-5 мкл;

0.5-1 мкл (100 ед.) Т4 ДНК лигазы.

Вода (Milli-Q) – до конечного объема 10 мкл

2. Инкубировать в течение 16 час при 4-6 °С.

3. Полученная лигазная смесь используется для трансформации бактерий.

Полимеразная цепная реакция

1) Приготовить ПЦР смесь:

- 10х буфер для полимеразы (поставляется вместе с ферментом) – 2.5 мкл

- ДНК полимеразы – 1 ед.активности

- Смесь дНТФ (10 мМ раствор каждого) – 0.5 мкл

- Праймер 1 (5 мкМ раствор) – 2 мкл

- Праймер 2 (5 мкМ раствор) – 2 мкл

- ДНК-матрица – 0.01 мкг

- H₂O – до 25 мкл

2) Смесь смешать, сбросить на центрифуге, и поставить в амплификатор.

3) Примерная программа амплификации выглядит следующим образом:

1-95 °С – 4 мин (первичное плавление ДНК)

2-95 °С – 30 сек (плавление ДНК)

3-50* °С – 30 сек (отжиг праймеров, *-температура отжига

рассчитывается по последовательности праймера

4-72 °С – 60 сек** (синтез ДНК, ** - время элонгации рассчитывается исходя из длины синтезируемого фрагмента, 1000 п.о. в минуту)

Повторять пункты 2-4 30 раз

5-72 °С – 5 мин (достройка незаконченных цепей ДНК)

Лабораторная работа №5. Трансформация бактериальных клеток

ЦЕЛЬ: Освоить метод трансформации клеток.

Трансформацией называется перенос чистой ДНК из одних клеток в другие. Трансформация была открыта бактериологом Ф. Гриффитсом в 1928 г. в опытах с пневмококками.

Процесс, в результате которого экзогенная (рекомбинантная) ДНК проникает в реципиентную клетку и вызывает у нее наследуемые изменения, называется трансформацией. Генетически трансформированные клетки принято называть трансформантами. Физиологическое состояние клетки, в котором она способна поглощать нуклеиновую кислоту из окружающей среды, называется компетентностью. Ряд бактерий обладают природной компетентностью, однако многие бактерии, а также дрожжи и

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

культивируемые клетки растений и животных природной компетентностью не обладают, поэтому восприимчивость к экзогенной ДНК у них индуцируют путем физического или химического воздействия.

Доступным и эффективным методом трансформации клеток *E. coli* является CaCl_2 -зависимая солевая трансформация: в присутствии ионов Ca^{2+} и одновалентных катионов на холоде (0°C) с последующим тепловым шоком (42°C) клетки поглощают добавленную в среду экзогенную ДНК. Наиболее эффективно компетентность индуцируется в активно делящихся клетках *E. coli*.

Разработан ряд модификаций данного метода, повышающих эффективность трансформации клеток.

В последнее время для индукции компетентности и трансформации клеток активно используют метод электропорации: кратковременное воздействие (5-20 мс) электрического поля высокой напряженности на клеточную мембрану приводит к формированию пор, время существования и размер которых достаточен для перехода в клетку молекул ДНК из внешней среды под действием осмотических сил.

Задание 1. Получение компетентных клеток *E. coli*

Реактивы и материалы

1. Клетки *E. coli*, штаммы DH5, HB101, JM109 или другие;
2. Среда LB (1 г пептона, 0,5 г дрожжевого экстракта, 1 г NaCl растворить в 100 мл воды; довести pH до 7,5 с помощью NaOH; стерилизовать автоклавированием в режиме 0,5 атм 30 мин);
3. Суточная культура клеток *E. coli* на чашках Петри с агаром LB (К 100 мл среды LB добавить 1,5 г агара; стерилизовать автоклавированием в режиме 0,5 атм 30 мин; охладить до температуры 50°C , разлить в чашки Петри. После застывания агара чашки подсушить. Посеять на чашки с агаром LB культуру клеток *E. coli*, инкубировать чашки в термостате при 37°C 16-20 часов до появления видимых колоний диаметром 2-3 мм);
4. Раствор RFI (К 130 мл воды добавить 2,4 г RbCl, 1,98 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6 мл 1 М раствора ацетата К с pH = 7,5, 0,3 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Довести pH раствора до 5,8 с помощью 0,2 М уксусной кислоты. Добавить 30 г глицерина, довести водой объем раствора до 200 мл. Стерилизовать полученный раствор пропусканием через мембранный фильтр с порами диаметром 0,22 мкм);
5. Раствор RFII (К 150 мл воды добавить 4 мл 0,5 М MOPS буфера с pH = 6,8, 0,24 г RbCl, 2,2 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Довести pH раствора до 6,8 с помощью NaOH. Добавить 30 г глицерина, довести водой объем раствора до 200 мл. Стерилизовать полученный раствор пропусканием через мембранный фильтр с порами диаметром 0,22 мкм);
6. Лед
7. Пробирки пластиковые объемом 1,5 мл и 2 мл;
8. Одноразовые наконечники вместимостью 1-20 мкл, 1-200 мкл, 100-1000 мкл.

Оборудование

1. Шейкер термостатируемый с платформой для шейкера (37°C)
2. Спектрофотометр
3. Центрифуга
4. Дозатор одноканальный (100-1000 мкл)
5. Стерильные пипетки (объем 5 мл и 10 мл)
6. Стерильные флаконы (объем 20 мл и 500 мл)
7. Петля бактериологическая
8. Стерильные центрифужные пробирки (объем 50 мл)
9. Стерильные эппендорфы

Выполнение работы

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

1. В стерильный флакон стерильной пипеткой отобрать 5 мл среды LB.
2. С чашки с суточной культурой клеток *E. coli* петлей отобрать одну хорошо изолированную колонию диаметром 2-3 мм и ресуспендировать ее в 5 мл среды LB. Инкубировать полученную суспензию клеток *E. coli* при встряхивании (на качалке) при 37 С 12-16 часов.
3. Стерильной пипеткой отобрать 1 мл полученной культуры клеток *E. coli* и добавить его к 100 мл среды LB. Инкубировать суспензию клеток *E. coli* при встряхивании при 37 С. Периодически стерильно отбирать пробы и определять оптическую плотность суспензии клеток при длине волны 590 нм (D590). Подрастить культуру клеток *E. coli* до плотности, при которой D590 = 0,5.
4. Стерильно разлить полученную суспензию клеток *E. coli* в 4 центрифужные пробирки по 24 мл (Vнач). Инкубировать пробирки во льду 15 минут.
5. Центрифугировать суспензию клеток в режиме 3000 об/мин, 4 С, 10 минут.
6. Слить надосадочную жидкость. К осадку клеток в центрифужных пробирках добавить охлажденный во льду раствор RFI (1/3Vнач, т.е. 8 мл). Осторожно ресуспендировать клетки, вращая пробирки между ладонями. Инкубировать пробирки во льду 40 мин.
7. Центрифугировать суспензию клеток в режиме 3000 об/мин, 4 С, 10 минут.
8. Слить надосадочную жидкость. К осадку клеток в центрифужных пробирках добавить охлажденный во льду раствор RFII (1/12,5Vнач, т.е. 1,92 мл). Осторожно ресуспендировать клетки, вращая пробирки между ладонями.
9. Разлить полученную суспензию клеток *E. coli* в стерильные эппендорфы по 0,2 мл, заморозить клетки в жидком азоте и хранить при – 70 С.

Задание 2. Трансформация клеток *E. coli* рекомбинантными плазмидными векторами.

Реактивы и материалы

1. Суспензия компетентных клеток *E. coli*, замороженная и хранящаяся при температуре - 70 С;
2. Препарат вектора со вставкой целевого фрагмента ДНК;
3. Среда LB (1 г пептона, 0,5 г дрожжевого экстракта, 1 г NaCl растворить в 100 мл воды; довести pH до 7,5 с помощью NaOH; стерилизовать автоклавированием в режиме 0,5 атм 30 мин);
4. Ампициллин (водный раствор с концентрацией антибиотика 100 мг/мл);
5. Чашки Петри с агаром LB, содержащем ампициллин (К 100 мл среды LB добавить 1,5 г агара; стерилизовать автоклавированием в режиме 0,5 атм 30 мин; охладить до температуры 50 С, добавить ампициллин в соотношении 1:1000, разлить в чашки Петри)
6. Одноразовые наконечники вместимостью 1-20 мкл, 1-200 мкл, 100-1000 мкл.

Оборудование

1. Водяная баня (42 °С)
2. Шейкер термостатируемый с платформой для шейкера (37 °С)
3. Центрифуга MiniSpin (Eppendorf).
4. Термостат для чашек Петри (37 °С)
5. Дозатор одноканальный (0,5-10 мкл)
6. Дозатор одноканальный (20-200 мкл)
7. Дозатор одноканальный (100-1000 мкл)

Выполнение работы

1. Пробирка с замороженными компетентными клетками *E. coli* (объем суспензии клеток 0,2 мл) оттаивает во льду.
2. Добавить 10 мкл препарата вектора со вставкой целевого фрагмента ДНК (после процедуры лигирования); осторожно перемешать содержимое пробирки, вращая пробирку между ладонями. (Концентрация вектора в препарате после лигирования 1 мкг/мл).
3. Инкубировать пробирку во льду 40 минут.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

4. Тепловой шок. Осторожно поместить пробирку на 90 секунд на водяную баню с температурой 42 °С.
5. Инкубировать пробирку во льду 30 минут.
6. Добавить 1 мл среды LB без антибиотика. Инкубировать культуру при слабом встряхивании или в сухом термостате 45 минут при 37 °С.
7. Добавить антибиотик ампициллин в соотношении 1:1000 (концентрация исходного раствора ампициллина 100 мг/мл).
8. Отобрать 0,2 мл суспензии клеток и посеять их на чашку Петри, содержащую агаризованную среду LB с ампициллином. Растереть стерильным шпателем.
9. Остаток культуры клеток в пробирке сконцентрировать путем центрифугирования при 9000 об/мин 1 минуту. Большую часть надосадочной жидкости удалить пипеткой. Осадок клеток ресуспендировать и посеять на чашку Петри, содержащую агаризованную среду LB с ампициллином. Растереть стерильным шпателем.
10. Инкубировать чашки 16-20 часов в термостате при 37 °С (чашки в термостат ставить в перевернутом положении агаром вверх!). Чашки с выросшими колониями клеток являются библиотекой. Хранить их в холодильнике при 4-8 °С в перевернутом положении (агаром вверх!).
11. После появления видимых колоний клеток *E. coli* диаметром 2-3 мм с помощью нитроцеллюлозного фильтра сделать отпечаток колоний на свежую чашку Петри с агаризованной средой LB и ампициллином. Или с помощью стерильных спичек пересеять выросшие колонии на свежие чашки Петри с агаром LB и ампициллином штрихами в определенном порядке. Инкубировать новые чашки Петри 16-20 часов в термостате при 37°С (чашки в термостат ставить в перевернутом положении агаром вверх!) до появления видимых колоний. Данные чашки Петри использовать для поиска (скрининга) колоний, содержащих вектор с целевым фрагментом ДНК.

Оформление результатов работы

Тема 3. Экспрессия и выделение целевых белков

Лабораторная работа №1. Отбор штаммов продуцентов белков

ЦЕЛЬ: Отбор штаммов продуцентов белков

1. Одну колонию с чашки с трансформантами перенести в 1 мл LB с соответствующим антибиотиком, и инкубировать в течение ночи при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин. *

* Количество отдельных колоний варьируется от 1 до максимального (до 9 или 18 и т. д., чтобы поместилось на один или два и т. д. ПЛАГ-гелей). Одна колония является контрольной – в нее не добавляется индуктор.

2. 200 мкл ночной культуры рекомбинантных штаммов *E. coli* перенести в 2 мл среды LB и выращивать 2–3 часа на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин при 37 °С до достижения ОП600=0.8.

3. Для снятия репрессии и индукции гиперпродукции белка внести ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ (для плазмид с лактозным оператором), или АГТ до конечной концентрации 0.2 мкг/мл (для плазмид с тетрациклиновым оператором), или арабинозу до конечной концентрации 0.2% (для плазмид с арабинозным оператором), и культивировать 4 часа при 25–30 °С на шейкереинкубаторе при 200 об/мин.

4. 30 мкл суспензии клеток смешать с 10 мкл 4-кратного буфера SB (см. раздел 2.8) и инкубировать при 95 °С в течение 10 мин.

5. Пробы анализировать с помощью ПЛАГ электрофореза в денатурирующих условиях.

6. Оставшиеся после приготовления проб для электрофореза клетки собрать центрифугированием в течение 2 мин при 13 тыс. об/мин либо в течение 10 мин при 3 тыс. об/мин. Удалить надосадочную жидкость. Хранить при -20 °С.

Лабораторная работа 2. Гиперпродукция белков в клетках *E. coli* и получение

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

клеточных экстрактов

ЦЕЛЬ: Гиперпродукция белков в клетках *E. coli* и получение клеточных экстрактов

1. Соскрести с чашки некоторое количество клеток рекомбинантного штамма *E. coli* и перенести их в 50 мл среды LB с соответствующим антибиотиком и инкубировать в течение ночи при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин.
 2. В 450 мл среды LB с соответствующим антибиотиком засеять 50 мл ночной культуры рекомбинантного штамма *E. coli* и инкубировать в течение 2 часов при 37 °С на шейкере-инкубаторе при 200 об/мин до ОП600~0.8.
 3. Добавить ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ, либо АГТ до конечной концентрации 0.2 мкг/мл, либо L-арабинозу до конечной концентрации 0.2% и культивировать 4 часа при 25–30 °С на шейкереинкубаторе при 200 об/мин.
 4. Клетки собрать с помощью центрифугирования в течение 15 мин при 4.4 тыс. об/мин.
 5. Клетки ресуспендировать в 20 мл буфера DB для последующей очистки на Ni-NTA сефарозе либо в 20 мл StW буфера для последующей очистки на стреп-тактин сефарозе.
 6. Разрушить клетки на ультразвуковом дезинтеграторе при 22 кГц во льду (7–10 озвучиваний по 1 мин с перерывами по 1 мин для охлаждения).
- Для этого фалкон с суспензией клеток поместить в круглую колбу с плоским дном (объемом либо 100, либо 250 мл) предварительно наполненную льдом и водой; опустить в фалкон с суспензией клеток кончик УЗ-зонда, как показано на рисунке ниже.
7. Полученный клеточный экстракт центрифугировать в течение 15 мин при 4.4 тыс. об/мин с охлаждением до 4 °С для удаления крупных клеточных обломков (дебриса).
 8. Полученный клеточный экстракт перенести в эппендорфы и центрифугировать в течение 15 мин при 13 тыс. об/мин с охлаждением до 4 °С 20 для удаления мелких клеточных обломков и затем использовать для аффинной хроматографии.

Оформление результатов работы

Лабораторная работа 3. Очистка белков на Ni-NTA сефарозе

ЦЕЛЬ: Очистка белков на Ni-NTA сефарозе

Хроматографию белков, содержащих гексагистидиновый таг проводить на Ni-NTA сефарозе.

1. 2 мл суспензии Ni-NTA сефарозы поместить в колонку для аффинной хроматографии.
2. Подготовить колонку к очистке белка путем промывания сефарозы 5 мл буфера HisW.
3. Подготовить клеточный экстракт для нанесения на колонку как описано в предыдущей лабораторной работе.
4. 50 мкл клеточного экстракта сохранить для дальнейшего анализа (проба 1).
5. Пропустить через колонку клеточный экстракт 3 раза, поскольку не весь целевой белок связывается с сефарозой за 1 пропускание.
6. 50 мкл клеточного экстракта после пропускания через колонку сохранить для дальнейшего анализа (проба 2).
7. Колонку промыть буфером HisW, наличие не связавшегося с носителем белка проверить при помощи раствора Брэдфорд. Промывать до тех пор, пока раствор Брэдфорд не перестанет синеть.

Для приготовления 10 мл рабочего раствора Брэдфорд необходимо 5 мл раствора Брэдфорд смешать с 5 мл деионизованной воды в маленьком стеклянном стаканчике, предварительно обработанным 96% спиртом.

В 10 лунок 96-луночного планшета, предварительно обработанного 96% спиртом, разлить по 200 мкл раствора Брэдфорд. Проверять наличие неспецифических белков смешением 30 мкл буфера, выходящего из колонки с раствором Брэдфорд.

8.Связавшийся белок элюировать буфером HisE. Элюировать до тех пор, пока раствор Брэдфорд подтверждает наличие белка во фракции (синет).

В 10 лунок 96-луночного планшета, предварительно обработанного 96% спиртом, разлить

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

по 200 мкл раствора Брэдфорд. Проверять наличие связавшихся белков смешением 5 мкл буфера, выходящего из колонки с раствором Брэдфорд.

9. После элюции промыть колонку 5 мл буфера HisW. Хранить колонку в холодильнике в буфере HisW.

10. Анализировать фракции элюции с помощью ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях.

Со временем Ni-NTA сефароза теряет связывающие свойства и ее нужно промывать и перезаряжать.

Для регенерации Ni-NTA сефарозы (для 1 мл сефарозы):

1. Колонку промыть 2 мл деионизованной воды.
2. Колонку промыть 5 мл 0.2М ЭДТА рН 8.0 (смывает ионы никеля).
3. Колонку промыть 5 мл 6М гуанидина гидрохлорида (удаляет неспецифически сорбированные белки).
4. Колонку промыть 10 мл деионизованной воды.
5. Зарядить колонку 2 мл 0.2М NiSO₄.
6. Промыть сефарозу от несвязавшихся ионов никеля 2 мл деионизованной воды.
7. Промыть колонку 10 мл буфера HisW.
8. Хранить колонку в холодильнике в буфере HisW.

Оформление результатов работы

Лабораторная работа 4. Очистка белков на Strep-tactin сефарозе

ЦЕЛЬ: Очистка белков на Ni-NTA сефарозе

Очистку белков со strep-тагом проводить на стреп-тактин сефарозе.

1. 2 мл суспензии стреп-тактин сефарозы поместить в колонку для аффинной хроматографии.
2. Подготовить колонку к очистке белка путем промывания сефарозы 5 мл буфера StW.
3. Подготовить клеточный экстракт для нанесения на колонку.
4. 50 мкл клеточного экстракта сохранить для дальнейшего анализа (проба 1).
5. Пропустить через колонку клеточный экстракт 3 раза, поскольку не весь целевой белок связывается с сефарозой за 1 пропускание.
6. 50 мкл клеточного экстракта после пропускания через колонку сохранить для дальнейшего анализа (проба 2).
7. Колонку промыть буфером StW, наличие не связавшегося с носителем белка проверить при помощи раствора Брэдфорд. Промывать до тех пор, пока раствор Брэдфорд не перестанет синеть.

Для приготовления 10 мл рабочего раствора Брэдфорд необходимо 5 мл раствора Брэдфорд смешать с 5 мл деионизованной воды в маленьком стеклянном стаканчике, предварительно обработанным 96% спиртом.

В 10 лунок 96-лучночного планшета, предварительно обработанного 96% спиртом, разлить по 200 мкл раствора Брэдфорд. Проверять наличие неспецифических белков смешением 30 мкл буфера, выходящего из колонки с раствором Брэдфорд.

8. Связавшийся белок элюировать буфером StE. Элюировать до тех пор, пока раствор Брэдфорд подтверждает наличие белка во фракции (синет).

В 10 лунок 96-лучночного планшета, предварительно обработанного 96% спиртом, разлить по 200 мкл раствора Брэдфорд. Проверять наличие связавшихся белков смешением 5 мкл буфера, выходящего из колонки с раствором Брэдфорд.

9. Анализировать фракции элюции с помощью ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях.

10. После элюции промыть колонку 7 мл буфера для регенерации StR.

11. Промыть колонку 15 мл буфера StW.

12. Промыть колонку 5 мл 0.1М NaOH.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

13. Хранить колонку в холодильнике в 0.1М NaOH.

Со временем стреп-тактин сефароза накапливает на себе неспецифически сорбированные белки, поэтому ее нужно очищать.

Для регенерации стреп-тактин сефарозы (для 1 мл сефарозы):

1. Колонку промыть 2 мл деионизованной воды.
2. Колонку промыть 5 мл 6М гуанидина гидрохлорида для удаления неспецифически сорбированных белков.
3. Колонку промыть 10 мл деионизованной воды.
4. Колонку промыть 10 мл буфера StW.
5. Хранить колонку в холодильнике в буфере StW

Раствор для регенерации StR = 0.012 г 2-[4-гидроксibenzeneазо] бензойной кислоты (НАВА) на 50 мл буфера StW;

0.1М NaOH = 0.2 г на 50 мл деионизованной воды.

Оформление результатов работы

Лабораторная работа 5. Определение концентрации белка по методу Мэрион Брэдфорд [Bradford, 1976]

ЦЕЛЬ: Определение концентрации белка по методу Мэрион Брэдфорд [Bradford, 1976]

Приготовление раствора Брэдфорд:

1. 0.02 г кумасси G-250 растворить в 10 мл этанола.
2. Добавить 20 мл ортофосфорной кислоты.
3. Довести объем раствора до 200 мл деионизованной воды.
4. Полученный раствор отфильтровать через бумажный фильтр.

Построение калибровочной кривой:

1. Приготовить водный раствор БСА (бычий сывороточный альбумин) 10 мг/мл.
2. Развести водный раствор БСА водой в 10 раз (100 мкл БСА 10 мг/мл + 900 мкл деионизованной воды) до 1 мг/мл.
3. Смешать 1:1 раствор Брэдфорд и деионизованную воду.
4. Разлить по 1 мл по 6 эппендорфам полученный раствор.
5. Добавить в эппендорфы 1, 2, 4, 8 и 16 мкл БСА 1 мг/мл.
6. Через 5 минут развития окраски измерить поглощение образцов против контроля при длине волны 595 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.
7. Построить точечную диаграмму, выставить линию тренда, вывести уравнение на график. Коэффициент перед X – коэффициент раствора Брэдфорд.

Определение концентрации белка:

1. Смешать 1:1 раствор Брэдфорд и деионизованную воду.
2. В 1 мл полученного раствора внести 1 мкл исследуемой пробы белка (если 1 мкл недостаточно, то внести еще; затем учесть это при расчете).
3. Через 5 минут развития окраски измерить поглощение образцов при длине волны 595 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см.
4. Концентрацию белка рассчитать по формуле:

число, полученное на ФЭК × коэфф. р – ра Брэдфорд /объем иссл. пробы белка в мкл = количество белка в мг/мл

Оформление результатов работы

8. ТЕМАТИКА КУРСОВЫХ, КОНТРОЛЬНЫХ РАБОТ, РЕФЕРАТОВ

Данный вид работы не предусмотрен УП.

9. ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ЭКЗАМЕНУ

1. Из каких частей состоит бактериальный ген?
2. Каково современное представление основной догмы молекулярной биологии?

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

3. Чем отличается классическая ПЦР от мультиплексной?
4. Механизм ПЦР. Характеристика компонентов реакционной смеси и основных стадий реакции.
5. Способы повышения эффективности и точности копирования ДНК-матрицы. Характеристика ферментов, используемых в ПЦР.
6. Способы повышения специфичности ПЦР. Влияние температуры, ионной силы, хаотропных агентов на специфичность реакции.
7. Моделирование клонирования по методу Гибсона.
8. Какие существуют требования к праймерам для клонирования?
9. Какие основные элементы вектора для клонирования?
10. Что такое система Р-М у бактерий?
11. Какие существуют методы для нокаута гена?
12. Почему в некоторых случаях невозможно использовать линейную ДНК для нокаутирования?
13. Назовите элективные маркеры для отбора клонов?
14. Какие ферменты входят в реакцию Гибсона и каковы их функции?
15. Каковы преимущества клонирования по методу Gibson?
16. Из каких этапов состоит любой метод трансформации бактерий?
17. Каким образом происходит обмен генетической информацией у бактерий?
18. Что означает понятие компетентности?
19. Какими методами достигается состояние компетентности?
20. Каковы сходства и различия геномной и плазмидной ДНК?
21. Какие существуют механизмы репликации плазмидной ДНК?
22. По каким признакам осуществляется классификация плазмидных ДНК?
23. Чем отличается нативная плазмидная ДНК от векторов клонирования?
24. Каков общий принцип полимеразной цепной реакции?
25. Какие существуют виды полимеразной цепной реакции?
26. Какие существуют типы полимераз и для каких целей их применяют?
27. На чем основан физический принцип электрофореза?
28. Какие существуют методы визуализации электрофореза нуклеиновых кислот?
29. Как выбрать оптимальный вариант проведения электрофореза различных молекул?
30. Как зависит скорость движения плазмидной ДНК в геле от ее формы?
31. Как оценить размер нуклеиновой кислоты в геле?
32. Что означают соотношения 260/280 и 260/230 при измерении концентрации НК?
33. Как измерить концентрацию нуклеиновых кислот?
34. Какие методы используются для идентификации рекомбинантных бактериальных клонов?
35. Какая связь между промотором T7 и штаммом E. coli BL21(DE3)?
36. Какие гены входят в состав лактозного оперона?
37. Какой механизм регуляции экспрессии лактозного оперона?
38. Для чего используется IPTG в молекулярной биологии?
39. Принцип аффинной хроматографии?
40. Как использовать аффинную хроматографию для очистки белковых молекул?
41. Для каких целей можно использовать аффинную хроматографию?
42. На каком принципе основан метод электрофореза белков в полиакриламидном геле?
43. На основании чего выбирается плотность геля для электрофореза белков?
44. Какие существуют методы визуализации электрофореза белковых молекул?
45. Как измерить концентрацию белковых молекул?
46. Как определить чистоту белков?
47. В чем состоит принцип окрашивания белковых гелей кумасси синим?

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

48. В чем состоит принцип окрашивания белковых гелей нитратным серебром?
49. В чем состоит принцип окрашивания белковых гелей Zn/имидазолом?

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

10. САМОСТОЯТЕЛЬНАЯ РАБОТА ОБУЧАЮЩИХСЯ

Форма обучения: очная

Название разделов и тем	Вид самостоятельной работы	Объем в часах	Форма контроля
Введение в генную инженерию. Принципы конструирования рекомбинантных организмов	Проработка учебного материала, тестирование, подготовка к сдаче экзамена.	9	Проверка домашнего задания, тестирование, экзамен.
Работа с нуклеиновыми кислотами в бактериальных клетках. Выделение ДНК из бактериальных клеток.	Проработка учебного материала, тестирование, подготовка к сдаче лабораторной работы, подготовка к сдаче экзамена.	9	Проверка домашнего задания, проверка лабораторной работы, тестирование, экзамен.
Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток.	Проработка учебного материала, тестирование, подготовка к сдаче лабораторной работы, подготовка к сдаче экзамена.	9	Проверка домашнего задания, проверка лабораторной работы, тестирование, экзамен.
Клонирование ДНК. Полимеразная цепная реакция	Проработка учебного материала, тестирование, подготовка к сдаче лабораторной работы, подготовка к сдаче экзамена.	9	Проверка домашнего задания, проверка лабораторной работы, тестирование, экзамен.
Электрофорез нуклеиновых кислот и визуализации результатов	Проработка учебного материала, тестирование, подготовка к сдаче лабораторной работы, подготовка к сдаче экзамена.	9	Проверка домашнего задания, проверка лабораторной работы, экзамен.
Трансформация бактериальных клеток	Проработка учебного материала, тестирование, подготовка к сдаче лабораторной работы, подготовка к сдаче экзамена.	9	Проверка домашнего задания, проверка лабораторной работы, экзамен.
Экспрессия и выделение	Проработка учебного	9	Проверка домашнего

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

целевых белков Отбор штаммов продуцентов белков	материала, тестирование, подготовка к сдаче лабораторной работы, подготовка к сдаче экзамена.		задания, проверка лабораторной работы, экзамен.
Гиперэкспрессия белков в большом объеме	Проработка учебного материала, тестирование, подготовка к сдаче лабораторной работы, подготовка к сдаче экзамена.	9	Проверка домашнего задания, проверка лабораторной работы, экзамен.
Очистка белков. Определение концентрации белка по методу Мэрион Брэдфорд [Bradford, 1976]	Проработка учебного материала, тестирование, подготовка к сдаче лабораторной работы, подготовка к сдаче экзамена.	9	Проверка домашнего задания, проверка лабораторной работы, экзамен.
4.Трансгенные растения и животные	Проработка учебного материала, тестирование, подготовка к сдаче экзамена.	4	Проверка домашнего задания, тестирование, экзамен.
5.Генная терапия	Проработка учебного материала, тестирование, подготовка к сдаче экзамена.	5	Проверка домашнего задания, тестирование, экзамен.

11. УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ И ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ

а) Список рекомендуемой литературы

основная

1. Загоскина Н. В. Генетическая инженерия : учебник и практикум / Н. В. Загоскина. - Москва : Юрайт, 2024. - 118 с. - (Высшее образование). - URL: <https://urait.ru/bcode/544770> . - Режим доступа: Электронно-библиотечная система Юрайт, для авториз. пользователей. - ISBN 978-5-534-16029-1 : 519.00.
2. загоскина Н. В. Биотехнология : учебник и практикум / Н. В. Загоскина, Е. А. Калашникова, Е. А. Живухина. - 4-е изд. ; испр. и доп. - Москва : Юрайт, 2024. - 384 с. - (Высшее образование). - URL: <https://urait.ru/bcode/543823> . - Режим доступа: Электронно-библиотечная система Юрайт, для авториз. пользователей. - ISBN 978-5-534-16026-0 : 1579.00.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

дополнительная

1. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия : учебно-справочное пособие / С. Н. Щелкунов ; С. Н. Щелкунов. - Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2017. - 514 с. - Книга находится в премиум-версии ЭБС IPR BOOKS. - Текст. - Гарантированный срок размещения в ЭБС до 21.05.2023 (автопродлонгация). - электронный. - Электрон. дан. (1 файл). - URL: <http://www.iprbookshop.ru/65273.html> . - Режим доступа: ЭБС IPR BOOKS; для авторизир. пользователей. - ISBN 978-5-379-02024-8.
2. Процессы и аппараты биотехнологии: ферментационные аппараты : учебное пособие для вузов / А. Ю. Винаров [и др.] ; под редакцией В. А. Быкова. — 2-е изд., перераб. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2024. — 274 с. — (Высшее образование). — ISBN 978-5-534-10765-4. — Текст : электронный // Образовательная платформа Юрайт [сайт]. — URL: <https://urait.ru/bcode/539934>

учебно-методическая (разработанная НПП, реализующими ОПОП ВО)

1. Расторгуева Е. В. Биоинжиниринг. Генная инженерия : методические указания для самостоятельной работы студентов и выполнению практических и лабораторных работ для студентов специальности 06.04.01 «Биология», Биофарминжиниринг / Е. В. Расторгуева ; Ульян. гос. ун-т. - 2024. - Неопубликованный ресурс. - URL: <http://lib.ulsu.ru/MegaPro/Download/MObject/16382>. - Режим доступа: ЭБС УлГУ. - Текст : электронный.

Согласовано:

Директор научной библиотеки / Бурханова М.М. /  / 2024
Должность сотрудника научной библиотеки *ФИО* *подпись* *дата*

б) Программное обеспечение

Для образовательного процесса студенту необходимо рабочее место с ПК с установленным следующим программным обеспечением: операционная среда ОС Windows/Linux; MS Office.

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

Профессиональные базы данных, информационно-справочные системы

1. Электронно-библиотечные системы:

1.1. Цифровой образовательный ресурс IPRsmart : электронно-библиотечная система : сайт / ООО Компания «Ай Пи Ар Медиа». - Саратов, [2024]. – URL: <http://www.iprbookshop.ru>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. - Текст : электронный.

1.2. Образовательная платформа ЮРАЙТ : образовательный ресурс, электронная библиотека : сайт / ООО Электронное издательство «ЮРАЙТ». – Москва, [2024]. - URL: <https://urait.ru>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. - Текст : электронный.

1.3. База данных «Электронная библиотека технического ВУЗа (ЭБС «Консультант студента») : электронно-библиотечная система : сайт / ООО «Политехресурс». – Москва, [2024]. – URL: <https://www.studentlibrary.ru/cgi-bin/mb4x>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст : электронный.

1.4. Консультант врача. Электронная медицинская библиотека : база данных : сайт / ООО «Высшая школа организации и управления здравоохранением-Комплексный медицинский консалтинг». – Москва, [2024]. – URL: <https://www.rosmedlib.ru>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст : электронный.

1.5. Большая медицинская библиотека : электронно-библиотечная система : сайт / ООО «Букап». – Томск, [2024]. – URL: <https://www.books-up.ru/ru/library/>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст : электронный.

1.6. ЭБС Лань : электронно-библиотечная система : сайт / ООО ЭБС «Лань». – Санкт-Петербург, [2024]. – URL: <https://e.lanbook.com>. – Режим доступа: для зарегистрир. пользователей. – Текст : электронный.

1.7. ЭБС Znanium.com : электронно-библиотечная система : сайт / ООО «Знаниум». - Москва, [2024]. - URL: <http://znanium.com>. – Режим доступа : для зарегистрир. пользователей. - Текст : электронный.

2. КонсультантПлюс [Электронный ресурс]: справочная правовая система. / ООО «Консультант Плюс» - Электрон. дан. - Москва : КонсультантПлюс, [2024].

3. eLIBRARY.RU: научная электронная библиотека : сайт / ООО «Научная Электронная Библиотека». – Москва, [2024]. – URL: <http://elibrary.ru>. – Режим доступа : для авториз. пользователей. – Текст : электронный

4. Федеральная государственная информационная система «Национальная электронная библиотека» : электронная библиотека : сайт / ФГБУ РГБ. – Москва, [2024]. – URL: <https://нэб.рф>. – Режим доступа : для пользователей научной библиотеки. – Текст : электронный.

5. Российское образование : федеральный портал / учредитель ФГАУ «ФИЦТО». – URL: <http://www.edu.ru>. – Текст : электронный.

6. Электронная библиотечная система УлГУ : модуль «Электронная библиотека» АБИС Мега-ПРО / ООО «Дата Экспресс». – URL: <http://lib.ulsu.ru/MegaPro/Web>. – Режим доступа : для пользователей научной библиотеки. – Текст : электронный.

Инженер ведущий



Щуренко Ю.В.

2024

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

3. МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ:

Реализация ОПОП ВО осуществляется в специальных образовательных пространствах ПИШ «ФармИнжиниринг» в соответствии с требованиями материально-технического и учебно-методического обеспечения. Специальные образовательные пространства ПИШ «ФармИнжиниринг» УлГУ представляют собой учебные аудитории для проведения занятий лекционного типа, занятий семинарского и лабораторного типов, выполнения проектов, групповых и индивидуальных консультаций, текущего контроля и промежуточной аттестации, компьютерные классы, а также помещения для самостоятельной работы.

Специальные образовательные пространства ПИШ «ФармИнжиниринг» УлГУ укомплектованы специализированной мебелью и техническими средствами обучения, служащими для представления учебной информации большой аудитории. Для проведения занятий лекционного типа предлагаются наборы демонстрационного оборудования и учебно-наглядных пособий, обеспечивающие тематические иллюстрации, соответствующие рабочим программам дисциплин (модулей).

Перечень материально-технического обеспечения, необходимого для реализации программы магистратуры, включает в себя лаборатории Специальных образовательных пространств ПИШ «ФармИнжиниринг», оснащенные лабораторным оборудованием:

- R&D-центр «Таргетные и промежуточные фармсубстанции», включает в себя:
 - R&D-центр по 3D-биопринтингу
 - R&D-центр «Таргетные молекулы для Lu-177» (совместный с компанией «Фарматом»)
 - Лаборатория визуализации
 - Лаборатория молекулярной и клеточной биологии
- R&D-центр «Компоненты для молекулярной биологии и фармсубстанций», включает в себя:
 - молодежная лаборатория разработки и синтеза пептидных фармацевтических субстанций и лекарственных средств
 - R&D-центр по синтезу олигонуклеотидов
 - Химико-аналитическая лаборатория
 - Лаборатория аналитического контроля
- R&D-центр по молекулярной генетике:
 - Лаборатория молекулярной биологии
 - R&D-центр по секвенированию (совместный с компанией «Тестген»)
 - Научно-исследовательский медико-биологический центр

Министерство науки и высшего образования РФ Ульяновский государственный университет	Форма	
Ф-Рабочая программа дисциплины		

Помещения для самостоятельной работы обучающихся оснащены компьютерной техникой с возможностью подключения к сети «Интернет» и обеспечением доступа в электронную информационно-образовательную среду организации. УлГУ обеспечен необходимым комплектом лицензионного программного обеспечения (состав определяется в рабочих программах дисциплин и подлежит ежегодному обновлению).

4. СПЕЦИАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ С ОГРАНИЧЕННЫМИ ВОЗМОЖНОСТЯМИ ЗДОРОВЬЯ

Организация реализации образовательной деятельности по ОПОП ВО для обучающихся из числа инвалидов и лиц с ОВЗ.

В случае необходимости, обучающимся из числа лиц с ограниченными возможностями здоровья (по заявлению обучающегося) могут предлагаться одни из следующих вариантов восприятия информации с учетом их индивидуальных психофизических особенностей:

- для лиц с нарушениями зрения: в печатной форме увеличенным шрифтом; в форме электронного документа; в форме аудиофайла (перевод учебных материалов в аудиоформат); в печатной форме на языке Брайля; индивидуальные консультации с привлечением тифлосурдопереводчика; индивидуальные задания и консультации;
- для лиц с нарушениями слуха: в печатной форме; в форме электронного документа; видеоматериалы с субтитрами; индивидуальные консультации с привлечением сурдопереводчика; индивидуальные задания и консультации;
- для лиц с нарушениями опорно-двигательного аппарата: в печатной форме; в форме электронного документа; в форме аудиофайла; индивидуальные задания и консультации.

Разработчик



Младший научный
сотрудник

Расторгуева Е. В.